云 南 植 物 研 究 2001, 23 (1): 52 ~ 54
Acta Botanica Yunnanica

除虫菊和茼蒿核糖体 DNA ITS 区的序列*

高娟[1]，邱明华[1**]，张亚平[2]
（1 中国科学院昆明植物研究所，云南 昆明 650204；2 中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明 650223）

Nucleotide Sequences of the Internal Transcribed Spacer Region of rDNA in *Pyrethrum cineraefolium* and *Chrysanthemum segetum*

GAO Juan[1], QIU Ming - Hua[1], ZHANG Ya - Ping[2]
(1 *Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China;
2 *Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650223, China)

Key words: *Pyrethrum cineraefolium*; *Chrysanthemum segetum*; rDNA; ITS1; ITS2
关键词：除虫菊；茼蒿；rDNA；ITS1；ITS2
中图分类号：Q 75　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253 - 2700(2001)01 - 0052 - 03

除虫菊（*Pyrethrum cinerariifolium*），又称白花除虫菊，是众所周知的著名杀虫植物，也是目前世界上唯一集约化栽培的天然杀虫剂原料，至今仍为肯尼亚、厄瓜多尔等一些国家的支柱产业。除虫菊的头状花序中含有 6 种 0.4 % ~ 2 %的杀虫成分，即除虫菊酯Ⅰ，Ⅱ（pyrethrin - Ⅰ，Ⅱ），瓜菊酯Ⅰ，Ⅱ（cinerin - Ⅰ，Ⅱ）和茉莉菊酯Ⅰ，Ⅱ（Jasmolin - Ⅰ，Ⅱ），6 个成分组成的复合植物杀虫剂，对家蝇的杀虫活性 LD50 为 15 ~ 20μg/g，对大白鼠的毒性 LD50 为 2124 ~ 2416 mg/kg，对温血动物毒性更低。面对呼唤绿色产业的 21 世纪，除虫菊的产业开发又成为天然农药开发的一个热点。我们在进行除虫菊产业化开发研究时，注意到该资源植物的分子生物学研究未见报道，而进行了除虫菊的 rDNA 间隔序列片段（ITS1，ITS2）碱基序列的分析。除虫菊属于小黄菊属（*Pyrethrum*），另一种重要的经济作物，在我国南方各省栽培作蔬菜食用的茼蒿（*Chrysanthemum segetum*）则是菊属较有代表性的植物，也尚未有分子生物学研究的报道。

核糖体 DNA 间隔序列片段（ITS1 和 ITS2）位于 rDNA 的 18s rDNA 和 26s rDNA 之间，ITS1 和 ITS2 间还有一段保守的 5.8s rDNA. ITS 区段是一段高度重复的序列片段，且其侧翼片段均为保守的片段，所以广泛应用于植物分子生物学研究。我们用 DNA 序列分析技术测定除虫菊和茼蒿的 rDNA 的 ITS 区间的碱基序列，并与菊科其它属的研究结果比较，以期获得它们特征的遗传信息，更好地开发利用这两种经济植物。本文报道了这些研究结果。

* 基金项目：中科院重大项目和院长基金、云南省人才基金资助。
** 通讯联系人
收稿日期：1999 - 12 - 27，2000 - 09 - 11 接受发表

材料和方法

除虫菊的新鲜叶片由云南泸西森菊公司除虫菊种植基地提供，茼蒿新鲜叶片为昆明茨坝集市上购得。

按照 CTAB（Cetyltrimethylammonium bromide）法提取总 DNA（clark，1998）。

PCR 扩增的目的片段为 rDNA 的 ITS 区段，包括 ITS1，5.8s rDNA 和 ITS2，共 610bp 左右。扩增引物为：F 5' - AAGCTTTCCGTAGGTGAAC - 3'，R 5' - TATGCTTAAACTCAGCGGG - 3'（Cerbak 等，1998）。

每个 PCR 反应总体积为 50μL，PCR 条件为 95℃预变性 5 min，再以 94℃变性 50 s，57℃退火 1 min，72℃延伸 1'20"秒进行 40 个循环，最后 72℃保温 5 min。扩增得到的 PCR 反应产物经 2.0% 的低熔点琼脂糖凝胶（美国 FMC 公司）电泳，切下所需的带，用 DNA 回收柱（上海华舜生物工程公司）进行回收，检测后用于测序。DNA 测序用美国 ABI 公司的 377 型全自动序列分析仪。Dye - terminator cycle sequencing（Perkin - Elmer）Kit 对每个个体进行正反两条链测序。

根据正反两条序列获得完整的基因序列，应用软件为 Megalign.（DNAStar Inc. 1996）. 排列如图 1。

```
1    GCAA-AGCAT AACGACCCGT GAACACGTAA AAACAACCGA GCGTCGAGTG GATTAAGCAC TT-GCTTGAT CCTCTCGA-T
2    .........G .......... .......... T..T...... ...C...... .G.....GT ..T.T..... .......GG.
1    GCTTTGTCGA TGTGCATTTA CTTGT-GTTC TTTTGGACAC GGTGAATGCG TCATTGGCGC AATAACAACC CCCGGCACAA
2    .......... .........A. ..C.A...C. ......G.CT T....G..T. .......... .......... ..........
1    TGTGTGCCAA GGAAAACTAA ACTTAAGAAG --GCTTGTTT CGTGTT-GCC CCGTTCGCGG TGTGCTCATG GGACGTGGCT
2    ..C....... .......... .......... .......... .A...T.... .......... .......... ...T......
1    TCTTTATAAT CACAAA-CGA CTGTCGGCAA CGGATATCTC GGCTCACGCA TCGATGAAGA ACGTAGCAAA ATGCGATACT
2    .......... .......... ..C....... .......... .......... .......... .......... ..........
1    TGGTGTGAAT TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTTTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGACG CCTTTTGGCC GAGGGCACGT
2    .......... .......... .......... .......... .......... ........A. .......... ..........
1    CTGCCTGGGC GTCACGCATC GCGTCGCCCC CAACAA---- ---------- ---ATGTTTG TTGGGGGCGG ATATTGGTCT
2    .......... .......... .......... .CG....... .......... .....C.A.. .......... ..........
1    CCCGTGCTCA TGGTGTGGTT GGCCAAAACA GGAGTACCT- T-CGATGGAC GCACGAACTA GTGGTGGTCG TAAAAACCCT
2    .......... ...C...... ........T. .....C.... .......... ....A..... .......... ..........
1    CGTTCTTTGC TCTGTGCTA- --GTCGCAAG GAAAAACTGT TCAAATAACC CCAATGTGTT GTCTTAGGAT GACGCTTCG-
2    .........T .T....TCGT TC..T....T .G..C...C. AT...A.... .-........ .......... ..........
```

图（1）　两种菊科植物的 ITS 序列

Fig.1　The ITS sequences of two species in the family Compositae

1　*Pyrethrum cinerefolium*　2　*Chrysanthemum segetum*

结果与讨论

通过比较这两条序列，可以看出：除虫菊和茼蒿的同源百分率为 87.4%，多态性百分

率为7.4%。其中ITS1为245bp，248bp，ITS2为200bp，202bp，ITS1比ITS2分别长45bp，46bp。而在Cucurbitaceae，Scrophulariaceae，Viscaseae中，ITS2比ITS1稍长，在茄科中两者差不多长，在豆科、禾本科和蔷薇科中则不一定。在研究过的被子植物中，5.8s rDNA的长度几乎是不变的，为163bp或164bp（Bruce等，1995），菊科植物中也如此，且它很保守，只在5'端和3'端有变异。

这两种植物的ITS1和ITS2的G+C%大约相当，这种现象符合GC平衡（G+C content balance），如茼蒿中ITS1和ITS2分别为48.8%，50.0%，除虫菊中ITS1和ITS2为47.8%，50.5%。GC平衡在被子植物中普遍存在，如葫芦科中melon ITS1和ITS2的G+C%为56%，60%（Kavanagh等，1988），*Mung bean* 为60%，59%（Schiebel等，1989），Tomato为68%，71%（Kiss等，1988）。GC平衡现在还未解释清楚，可能的原因为：1）ITS1和ITS2和核糖体RNA的成熟有关，本身会形成茎环状二级结构。特殊有序的结构有利于ITS1和ITS2的切除，GC平衡反映了一种选择压力（Ramon等，1990）；2）和环境因素有关，尤其是温度（Bernardi等，1988）。生长在温和地区的被子植物的G+C%要比生活在干旱地区的被子植物高（Salinas等，1988）。因为富含GC有利于保证在DNA，RNA的热稳定性。

结合前人的研究结果，我们从基因库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez）中录取了几种菊科植物（*Bidens femlifolia* U67108，*Cosmosatro sanguineus* AF165847，*Dahlia scapigeroides* AF165845，*Rachelia glaria* AF115923，*Raoulia* sp CANU3459 AF115924，*Dendranthema grandifolium* AF116239）的ITS区和这两种植物进行比较，发现除虫菊和茼蒿的ITS2要比其他菊科植物的短些，分别为200bp，202bp。主要原因是在ITS区的437bp处有一段17bp的缺失（或插入），而在ITS1中没有大片段的插入或缺失现象，只有1~4bp的插入或缺失。在ITS1中有65.2%的变异位点，在ITS2中有53.7%的变异位点。在除虫菊和茼蒿的点突变位点的比较中可以看到TC间的转换要高于AG间的转换。分析原因，ITS区是一段高度甲基化的基因，甲基化的C发生脱氨基反应生成T。C-T的转变在ITS的进化中起着重要的作用。

本文只是对除虫菊和茼蒿等植物的ITS区序列的初步探讨，更多有关遗传信息的分子生物学问题还需作进一步研究。

致谢 实验过程中得到了昆明动物所分子遗传学开放实验室全体人员的帮助。

〔参考文献〕

顾红雅，翟礼嘉主译，1998. 植物分子生物学——实验手册〔M〕. 北京：高等教育出版社，6~7

Baldwin B G, Sanderson MJ, Porter J M, *et al*, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuale source of evidence on angiosperm phylogeny〔J〕. *Ann Missouri Bot Gard*, **82**: 247~277

Bernardi G, Mouchiroud D, Gautier C, 1988. Compositional Patterns in Vertebrate Genmes: Conservation and Change in Evolution〔M〕. *J Mol Evol*, **28**: 7~18

Kavanagh T A, Timmis J N, 1988. Structureof melon rDNA and nucleotide sequence of the 17~25s spacer region〔J〕. *Theor Appl Genet*, **76**: 673~680

Kiss T, Kiss M, Abel S, *et al*, 1988. Nucleotide sequence of 17s~25s spacer region from tomato rDNA〔J〕. *Nucleic Acids Res*, **16**: 7179

〔下转71页〕

〔上接 54 页〕

Ramon A T, Canal M, Hemlebenv, 1990. GC Balance in the Internal Transcribed Spacers ITS1 and ITS2 of Nuclear Ribosomal RNA Genes 〔J〕. *J Mol Evol*, 30: 170 ~ 181

Salinas, Matassi G, Montero L M, *et al*, 1988. Compositional compartmentalization and compositional patterns in the nuclear genomes of plants 〔J〕. *Nucleic Acids Res*, 16: 4269 ~ 4285

Schiebel K, Hemleben V, 1989. Nucleotide sequence of 18s ~ 25s spacer region from rDNA of mung bean 〔J〕. *Nucleic Acids Res*, 17: 2852